



## **Papel de la glutaminasa en la progresión de esteatosis a esteatohepatitis**

**Lugar de realización:** Grupo SeLiver (Laboratorio 213), Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)

Marzo 2022 – Junio 2022

**Tutor:**

Manuel Romero Gómez

**Co-tutora:**

Rocío Muñoz Hernández

**Alumna:**

Vanessa García Fernández

ROMERO  
GOMEZ  
MANUEL -  
34061923G

Firmado digitalmente  
por ROMERO GOMEZ  
MANUEL - 34061923G  
Fecha: 2022.06.05  
22:38:39 +02'00'

MUÑOZ  
HERNANDEZ  
Z ROCIO -  
48820459S

Firmado digitalmente por  
MUÑOZ  
HERNANDEZ ROCIO  
- 48820459S  
Fecha: 2022.06.05  
17:58:34 +02'00'

GARCIA  
FERNANDEZ  
VANESSA -  
72547888T

Firmado digitalmente por  
GARCIA FERNANDEZ  
VANESSA -  
72547888T  
Fecha: 2022.06.04  
17:42:16 +02'00'

## ÍNDICE

1. Resumen y palabras clave .....	1
2. Introducción	
a. Esteatosis hepática metabólica .....	2
b. Glutaminolisis .....	3
i. Glutaminolisis y esteatosis .....	4
ii. Glutaminolisis y fibrosis .....	7
c. Tratamiento .....	7
d. Factores genéticos .....	8
3. Objetivos .....	10
4. Materiales y métodos	
a. Reclutamiento de pacientes .....	11
b. Determinación de los niveles de glutamina/glutamato .....	12
c. Determinación de polimorfismos genéticos en <i>SCLIA3</i> y <i>SCLIA5</i> .....	14
d. Análisis del microsatélite en la región promotora del gen <i>GLS</i> .....	15
e. Aislamiento de células epiteliales humanas de orina .....	15
f. Caracterización de las células epiteliales .....	16
g. Reprogramación de células epiteliales a iPSCs.....	17
h. Análisis estadístico .....	19
5. Resultados	
a. Características basales de los pacientes .....	20
b. Niveles de glutamato, glutamina y ratio glutamato/glutamina .....	21
c. Niveles de glutamato, glutamina y ratio glutamato/glutamina en función de la fibrosis .....	21
d. Estudios de los polimorfismos genéticos en <i>SLCIA3</i> y <i>SLCIA5</i> en Pacientes EHmet y su correlación con los niveles de glutamina- glutamato solubles en suero .....	23
e. Estudio/Determinación del microsatélite de la región promotora del gen <i>GLS</i> y su correlación con los niveles de glutamina-glutamato Solubles en suero.....	24
f. Aislamiento de células epiteliales a partir de orina de pacientes .....	27
g. Caracterización de células epiteliales.....	28
h. Desdiferenciación de células epiteliales a iPSCs .....	30
6. Discusión.....	34

7. Conclusión.....	37
8. Bibliografía.....	38

## RESUMEN

La esteatosis hepática metabólica (EHmet) es una enfermedad compleja caracterizada por el acúmulo de grasa en los hepatocitos, pudiendo progresar a cirrosis o carcinoma hepatocelular. Actualmente, existe un gran interés en la búsqueda de un método diagnóstico preciso y fiable, así como una gran necesidad de establecer una opción terapéutica eficaz. Los estudios actuales respaldan la idea de que la enzima glutaminasa (GLS) podría ser una buena diana terapéutica para frenar el avance de la enfermedad ya que, está fuertemente implicada en la aparición de la esteatosis y la fibrosis.

**Objetivos:** (i) Determinar los niveles solubles de glutamina y glutamato en pacientes con EHmet diagnosticados por biopsia hepática. (ii) Estudiar polimorfismos genéticos en *SLC1A3* y *SLC1A5*, ambos implicados en las rutas de glutaminólisis, en pacientes EHmet y su correlación con los niveles de glutamina-glutamato solubles en suero. (iii) Análisis del microsatélite en la región promotora del gen *GLS* y su correlación con los niveles de glutamina-glutamato solubles en suero. (iv) Aislamiento de células epiteliales de orina de pacientes con EHmet con distintos polimorfismos genéticos. (v) Caracterización de las células epiteliales. (vi) Desarrollo de un modelo *in vitro* de EHmet, basado en iPSCs provenientes de células epiteliales del paciente.

**Materiales y métodos:** (i) Reclutamiento de pacientes para el estudio. (ii) Determinación de los niveles de glutamato y glutamina séricos en pacientes. (iii) Determinación de los polimorfismos genéticos en *SCL1A3* y *SCL1A5* en los pacientes. (iv) Análisis del microsatélite en la región promotora del gen *GLS*. (v) Aislamiento de células epiteliales de orina de pacientes. (vi) Reprogramación a iPSCs.

**Resultados:** Existe relación entre el ratio de glutamato/glutamina con la severidad de la patología y con la fibrosis. Además, la presencia de un alelo del microsatélite largo o corto está relacionado con la severidad de la enfermedad, la esteatosis y el ballooning.

**Conclusión:** Los pacientes con esteatohepatitis mostraron niveles significativamente superiores de glutamato y del ratio glutamato/glutamina. Existe una relación entre la longitud del microsatélite *GLS* y la presencia de esteatosis simple. Además, el aislamiento de células epiteliales de orina es una técnica que nos permite obtener iPSCs de manera no invasiva.

## PALABRAS CLAVE

EHmet, iPSCs, glutaminólisis, glutamato, *GLS*, microsatélite

# INTRODUCCIÓN

## ESTEATOSIS HEPÁTICA METABÓLICA

La Esteatosis Hepática metabólica (EHmet) o NAFLD (*non-alcoholic fatty liver disease*) es una patología que tiene una prevalencia del 25%, pero que está aumentando debido a la pandemia de la obesidad, siendo una enfermedad de gran relevancia en nuestra sociedad<sup>(1)</sup>. Además, se ha convertido una de las causas más comunes de enfermedad hepática en el mundo<sup>(2)</sup>.

EHmet es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de esteatosis hepática (SS, *simple steatosis*), que es la característica benigna de la enfermedad, donde se presenta un acúmulo excesivo de triglicéridos en los hepatocitos. La enfermedad puede progresar dando lugar a una esteatohepatitis (NASH, *non-alcoholic steatohepatitis*), donde la inflamación y el *ballooning* (degeneración del hepatocito) juegan un papel importante. Como estamos ante una enfermedad progresiva, puede llegar a desarrollarse cirrosis e incluso cáncer hepático<sup>(3)</sup> (Figura 1).

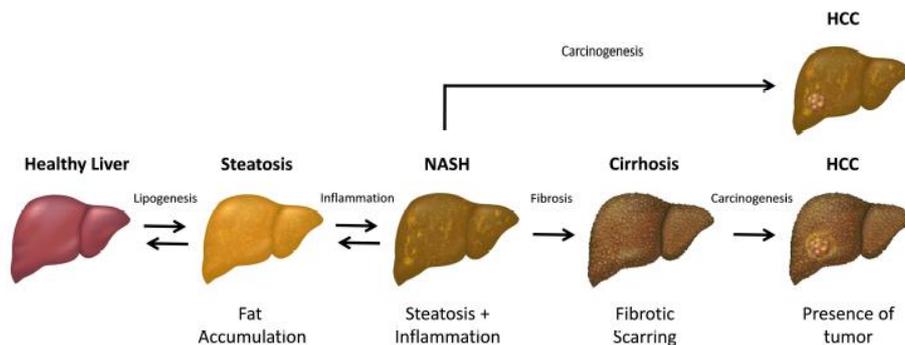
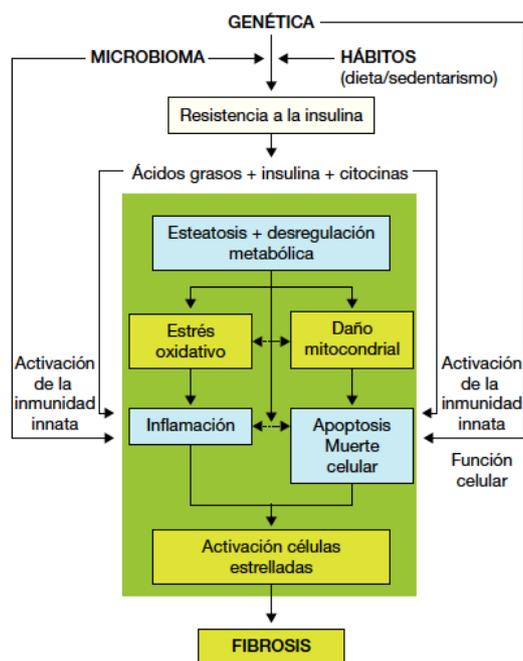


Figura 1. Desarrollo de la enfermedad<sup>(4)</sup>

Además de afectar al hígado, EHmet puede afectar a otros órganos, considerándose una enfermedad multisistémica. Los pacientes tienen un riesgo aumentado de padecer diabetes mellitus tipo II, enfermedades cardíacas y cardiovasculares o incluso enfermedad renal crónica<sup>(5)</sup>.

Aunque sea una de las enfermedades más relevantes del mundo, su patogénesis no se conoce completamente todavía, ya que es compleja y multifactorial<sup>(2)</sup>. Es una enfermedad progresiva que tiene distintas manifestaciones y velocidad de progresión en cada paciente, ya que hay muchos factores de riesgo que entran en juego. Algunos de los factores de riesgo más importantes son el metabolismo, factores genéticos, la microbiota intestinal o factores ambientales entre otros<sup>(6)</sup>.



**Figura 2.** Representación de la Fisiopatología de la enfermedad hepática metabólica (Madrilejos R, 2018)<sup>(7)</sup>.

Uno de los mecanismos más importantes por los que se va a desarrollar la enfermedad es la superación de la capacidad del hígado para metabolizar los sustratos energéticos primarios, carbohidratos y ácidos grasos, provocando estrés hepatocelular, lesiones e incluso muerte hepatocelular. El estrés es uno de los desencadenantes de la fibrosis<sup>(3)</sup>. La acumulación de ácidos grasos libres en el hígado es uno de los primeros eventos por los que se caracteriza la enfermedad <sup>(2)</sup>. Además, va a ocurrir una reducción de la beta-oxidación de los ácidos grasos, aumento de la lipogénesis *de novo* y alteraciones en la secreción de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)<sup>(8)</sup>.

Debido al estrés hepatocelular, las células hepáticas estrelladas (HSC) van a adquirir un fenotipo activo dando lugar a miofibroblastos<sup>(9)</sup>, que son capaces de producir matriz extracelular (MEC), generando un desbalance entre la producción y degradación de MEC. El exceso de MEC va a producir una acumulación indeseada en el hígado, provocando la fibrosis. Esta fibrosis puede seguir progresando y evolucionar a cirrosis, e incluso, a cáncer hepático<sup>(10)</sup>.

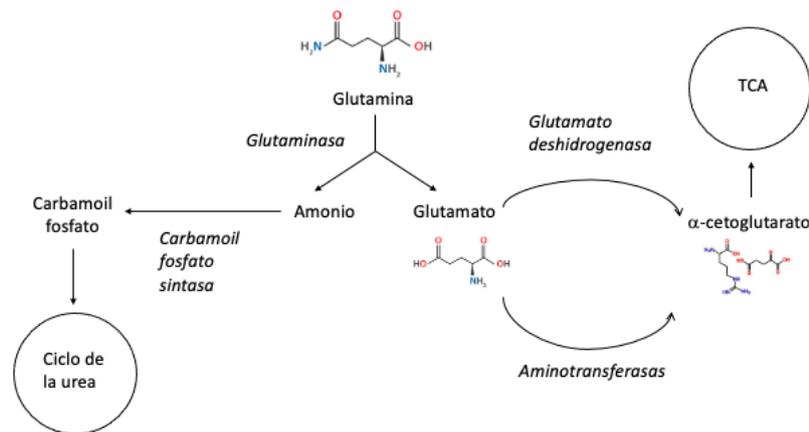
### **GLUTAMINOLISIS**

La **glutaminasa** es una de las enzimas principales que regulan el metabolismo de la glutamina ya que es la encargada de catalizar el primer paso del proceso de obtención de glutamato y

amonio a partir de glutamina. El amonio obtenido es detoxificado por el hígado, por lo que los pacientes que tengan afectaciones hepáticas no van a ser capaces de eliminar ese amonio, como ocurre en los pacientes EHmet<sup>(11)(12)</sup>. Por ello, los niveles de amonio estarán aumentados, provocando cambios morfológicos y activación de las HSC o incremento de la producción de ROS entre otras alteraciones<sup>(13)</sup>.

Existen dos tipos de isoformas de la glutaminasa: GLS1 y GLS2. La GLS2 es la principal enzima del hígado y su gen se localiza en el cromosoma 12, mientras que GLS1 es más ubicua y se encuentra en los riñones principalmente y está codificada por un gen del cromosoma 2. Se ha visto que en pacientes con cirrosis o cáncer hepático existe un cambio metabólico y GLS1 pasa a ser la isoforma más abundante en el hígado. La relevancia de la expresión de esta isoforma en EHmet se conoce poco<sup>(14)(15)</sup>.

El glutamato que ha formado la glutaminasa a partir de glutamina es catabolizado por la glutamato deshidrogenasa o las transaminasas [glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), glutamato piruvato transaminasa (GPT) y fosfoserina transaminasa (PSAT)], dando como producto el  $\alpha$ -cetoglutarato, que se oxidará mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA)<sup>(16)</sup>. Por otro lado, el amonio generado por la glutaminasa será detoxificado mediante el ciclo de la urea.



**Figura 3.** Representación del Metabolismo de la glutamina en condiciones fisiológicas

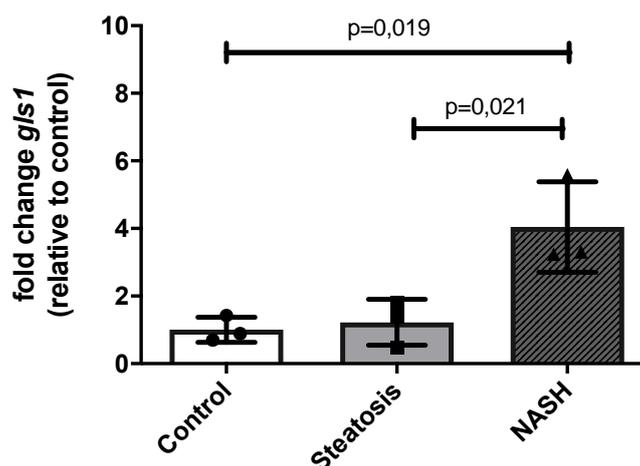
### **Glutaminolisis y esteatosis**

Una característica de EHmet es la acumulación de lípidos en los hepatocitos. Ese acúmulo intrahepático de triglicéridos podría estar causado por una secreción disfuncional de las VLDL<sup>(17)</sup>. En modelos animales con dieta deficiente en colina, que es el sustrato principal de la

síntesis de los fosfolípidos de la membrana de las VLDL, se produce un acumulo de grasa intrahepática<sup>(18)</sup>. Si además de déficit de colina, se propone un modelo animal con dieta deficiente también en metionina, se encuentran cambios significativos en los niveles séricos de glutamina<sup>(19)</sup>. Además, se ha demostrado que en el modelo animal con dicha alimentación durante seis semanas, aumenta los niveles de expresión tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico de GLS1<sup>(15)</sup>. Simon et al, también han demostrado recientemente que hay una sobreexpresión de GLS1 tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína en pacientes con esteatohepatitis frente a controles sanos. En cambio, la expresión de GLS2 disminuye en los pacientes con esteatohepatitis frente a controles sanos<sup>(15)</sup>, confirmando que GLS1 juega un papel importante en la patogenia del EHmet.

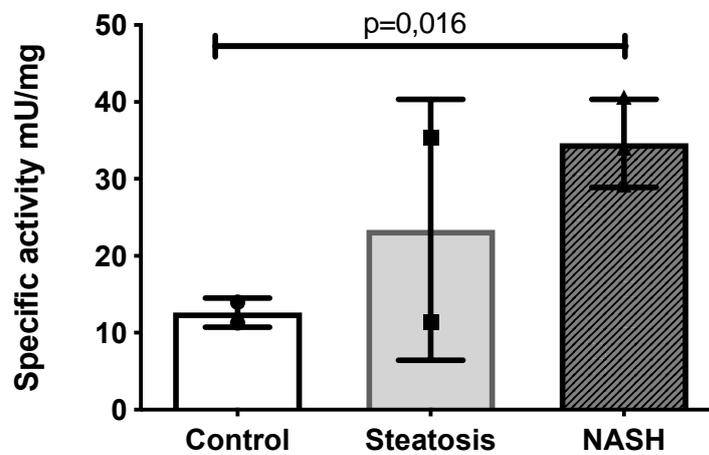
Además, Simon et al, también ha demostrado que la inhibición de GLS1 en el modelo deficiente en colina y metionina, reducía el estrés oxidativo y restauraba la síntesis y exportación de triglicéridos VLDL, reduciendo la esteatosis hepática<sup>(15)</sup>. Por todo ello, se concluye que GLS1 está relacionada con la esteatosis hepática en EHmet.

Trabajos previos de nuestro grupo realizados en un modelo animal HFHCC (High-Fat High Carbohydrate diet) mostraron un incremento en los niveles relativos de ARNm en el tejido de ratones con NASH vs control y esteatosis simple ( $p=0,019$  y  $p=0,021$ , respectivamente) (Figura 4)



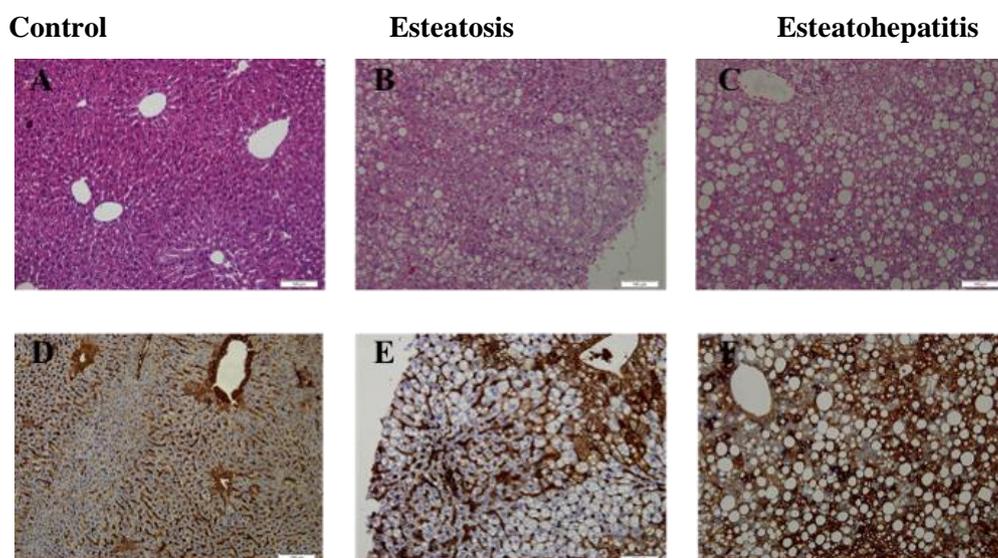
**Figura 4.** Representación de la media de expresión de los niveles de GLS1 respecto al grupo control  $\pm$  la desviación estándar.

Además, la actividad enzimática de GLS también estaba aumentada en los ratones esteatohepatitis respecto al grupo control ( $p=0,016$ ) (Figura 5).



**Figura 5.** Actividad específica de GLS1 expresada en mU/mg. Los datos representan la media de actividad en cada grupo  $\pm$  la desviación estándar.

En cuanto a los niveles proteicos de GLS1, también se observa un incremento a medida que va progresando la enfermedad (Figura 6).



**Figura 6.** Tinción IHQ con hematoxilina-eosina en tejido de ratón en los diferentes estadios de la enfermedad; control, esteatosis y esteatohepatitis (A, B y C). Tinción IHQ con GLS1 en tejido de ratón en los diferentes estadios de la enfermedad (D, E y F).

## **Glutaminolisis y fibrosis**

Las HSC son un factor importante para la generación de fibrosis y se cree que la glutaminolisis es relevante en este proceso. En cáncer, la glutaminolisis es importante para la reprogramación metabólica necesaria que tiene que ocurrir en las células, y en la fibrosis, la glutaminolisis va a permitir que las HSC sean capaces de cumplir la alta demanda bioenergética y biosintética de los miofibroblastos. Se ha visto que la inhibición de la glutaminolisis reduce la acumulación de miofibroblastos debido a una supresión de la activación de las HSC<sup>(14)</sup>.

Como hemos comentado anteriormente, las HSC que tienen un fenotipo quiescente, van a dar lugar a miofibroblastos, que tienen un fenotipo activado. Los miofibroblastos presentan una capacidad proliferativa, migratoria y fibrogénica<sup>(9)</sup>. La activación de las HSC produce un aumento de MEC, generando así la fibrosis hepática.

Se ha visto un aumento de la expresión génica de los genes que van a regular la glutaminolisis durante el cambio fenotípico de las HSC. Además, sabiendo que los miofibroblastos son dependientes de la glutamina, Du et al,<sup>(20)</sup> analizaron los niveles de glutamato y glutamina sérica en modelos animales, en un grupo de ratones tratado con CCl<sub>4</sub>, que causa hepatotoxicidad, y se compararon con un grupo control. Se vio que los ratones tratados tenían niveles aumentados de glutamato y niveles disminuidos de glutamina, aumentando así el ratio glutamato/glutamina. Estos datos fueron correlacionados con el nivel de fibrosis y se vio que el ratio glutamato/glutamina tenía relación con la acumulación de miofibroblastos y la severidad de la fibrosis. Los hígados que tenían mayor grado de fibrosis tenían disminuida la concentración de glutamina y aumentada la concentración de glutamato en comparación con los no fibróticos. Además, para ver el rol de la glutaminolisis en el crecimiento y fibrogénesis de las HSC, inhibieron GLS1 y vieron que se suprimía el crecimiento de los miofibroblastos y disminuía la expresión de los marcadores de ciclo celular como ciclina D1 y los marcadores fibrogénicos como desmina y  $\alpha$ SMA<sup>(20)</sup>. Estos resultados muestran que la GLS1 tiene un papel importante en la activación de las HSC y por ello, en la fibrogénesis.

## **TRATAMIENTO**

Uno de los problemas que tiene esta patología es que aún no hay ningún tratamiento farmacológico eficaz aprobado para los pacientes, siendo las intervenciones dietéticas y de estilo de vida lo más aceptado en la actualidad. En caso de enfermedad avanzada, la opción terapéutica es el trasplante hepático, con todos sus inconvenientes, entre el que encontramos la escasa cantidad de órganos disponibles. A pesar de la gran variedad de ensayos clínicos enfocados al tratamiento de EHmet, ningún fármaco ha demostrado ser lo suficientemente

eficaz. Por ello, existe una necesidad de buscar nuevas moléculas eficaces o nuevas dianas terapéuticas para ofrecer a los pacientes un tratamiento farmacológico. Las principales terapias se centran en la reducción de la acumulación de lípidos en los hepatocitos, en la reducción de la inflamación y el daño hepático y la fibrosis <sup>(21)</sup>. Dado la relación que se ha visto entre la glutaminólisis y diferentes aspectos de EHmet (esteatosis y fibrosis), podría ser una diana potencial para futuros tratamientos farmacológicos en esta enfermedad<sup>(20)</sup>.

### **FACTORES GENÉTICOS**

Los factores genéticos, en concreto, ciertos polimorfismos, están involucrados en la enfermedad ya que pueden alterar el desarrollo y/o la susceptibilidad de la enfermedad e incluso la respuesta del paciente al tratamiento<sup>(22)</sup>. Dado la importancia que parece tener la glutaminólisis en el desarrollo de la enfermedad, el estudio de los polimorfismos genéticos asociados a los genes implicados en esta ruta podría ser de gran interés:

- *rs313853*: se localiza en la región del gen *SCL1A5*, en el cromosoma 19. Este gen codifica para un transportador de aminoácidos dependiente de sodio. Se va a producir un cambio T>C, produciendo consecuencias en la región intrónica o 5'UTR. Se ha visto que la expresión de *SCL1A5* está aumentada cuando los requerimientos celulares de glutamina son mayores, para obtener energía mediante la glutaminólisis<sup>(23)</sup>.
- *rs2562582*: se localiza en la región del gen *SLC1A3*, en el cromosoma 5. Codifica para un transportador de aminoácidos dependiente de sodio, que tiene una alta afinidad por el glutamato. Se produce un cambio C>T.

Recientemente se ha descrito la relación que puede tener un microsatélite en el gen *GLS*, que codifica para la enzima glutaminasa, con la aparición de encefalopatía hepática en pacientes con cirrosis. Este microsatélite está compuesto por una repetición de tripletes GCA en la región promotora del gen *GLS*. El número variable de las repeticiones se asoció a mayor riesgo de desarrollar encefalopatía hepática<sup>(24)</sup>.

Dado que los factores genéticos, además de modular el desarrollo de la enfermedad, también podrían definir la respuesta al tratamiento del paciente, sería interesante desarrollar modelos in vitro con células autólogas a fin de poder tener un modelo eficaz, fisiológico y con la carga genética del paciente para testar posibles fármacos.

Para ello, se podrían analizar distintos modelos que nos permitan analizar dichos fármacos. Existen diversos tipos células que nos pueden ayudar para generar un modelo in vitro para testar los fármacos, siendo lo ideal un modelo 3D, por ejemplo, un organoide hepático. Aunque es un modelo muy fisiológico, presenta algunas limitaciones, entre ellas, obtener hepatocitos adultos no es tarea fácil, ya que su obtención implicaría un número mínimo de hepatocitos viables y en buen estado. Para ello, se tendrían que utilizar hígados que serían buenos candidatos para trasplante hepático. Además, los hepatocitos adultos son difíciles de manipular, criopreservar y expandir en cultivo. Por eso, el uso de una fuente de hepatocitos inagotable sería lo ideal para poder desarrollar estos modelos. El uso de células madre, nos va a permitir obtener esa fuente inagotable de células que nos permita desarrollar los modelos in vitro<sup>(25)</sup>. Existen muchos tipos diferentes de células madre en base a su origen, características y potencia, otorgando un gran abanico de posibilidades para tratar las enfermedades hepáticas: células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células progenitoras endoteliales, células mesenquimales o células madre pluripotenciales inducidas<sup>(26)</sup>. Las células madre también van a permitir la regeneración del hígado para paliar los efectos de las patologías hepáticas. La investigación en células madre es extensa y se están investigando diferentes opciones a fin de realizar terapia celular y evitar en un futuro, el trasplante hepático. que podrían servir para solucionar los problemas que puede generar el trasplante hepático<sup>(26)</sup>.

Las células madre pluripotenciales inducidas tienen la capacidad de dar lugar a muchos tipos celulares ya que han obtenido su pluripotencialidad mediante reprogramación artificial. Fueron descritas por el Dr. Yamanaka, que reprogramó un fibroblasto murino a iPSCs utilizando los factores de transcripción denominados factores de Yamanaka: Oct3/4, c-Myc, Klf4 y Sox2. Las iPSCs permiten obtener células pluripotenciales histocompatibles con el paciente, evitando el aislamiento de células madre del órgano completo<sup>(27)</sup>. Lo más ventajoso de estas iPSCs es su alta capacidad proliferativa y su capacidad de diferenciación a cualquier tipo celular, lo que nos va a permitir, en nuestro caso, obtener una fuente de hepatocitos con la carga genética del paciente para el testeo de fármacos en pacientes con EHmet. Al obtener estas iPSCs de la orina de los pacientes, estaríamos utilizando una técnica no invasiva para el paciente. De esta manera, el paciente no estaría sometido a una prueba dolorosa o molesta para la obtención de las células madre.

## OBJETIVOS

1. Determinar los niveles solubles de glutamina y glutamato en pacientes con EHmet diagnosticados por biopsia hepática.
2. Estudiar polimorfismos genéticos en *SLC1A3* y *SLC1A5*, ambos implicados en las rutas de glutaminólisis, en pacientes EHmet y su correlación con los niveles de glutamina-glutamato solubles en suero.
3. Análisis de los microsatélites de la región promotora del gen *GLS* y su correlación con los niveles de glutamina-glutamato solubles en suero.
4. Aislamiento de células epiteliales de la orina de pacientes con EHmet con distintos polimorfismos genéticos.
5. Desarrollo de un modelo *in vitro* de EHmet, basado en iPSCs provenientes de células epiteliales del paciente, aportando la carga genética del individuo de manera no invasiva.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. RECLUTAMIENTO DE PACIENTES

El Trabajo de Fin de Máster se ha realizado en el laboratorio de Investigación clínica y traslacional en Enfermedades Hepáticas y Digestivas (SeLiver group, laboratorio 213) en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).

Los pacientes se reclutaron en el Hospital Universitario Virgen del Rocío, en el servicio de Digestivo. Todos los pacientes fueron sometidos previamente a biopsia hepática para su diagnóstico de enfermedad hepática metabólica (esteatosis simple o esteatohepatitis – NASH – *non-alcoholic steatohepatitis*) y su posterior manejo terapéutico. Para su correcta clasificación, las muestras de las biopsia las analizó un patólogo del servicio de anatomía patológica de nuestro hospital que nos emitió un informe con los hallazgos encontrados a nivel histológico para, posteriormente clasificar a los pacientes en función del SAF score<sup>(28)</sup>.

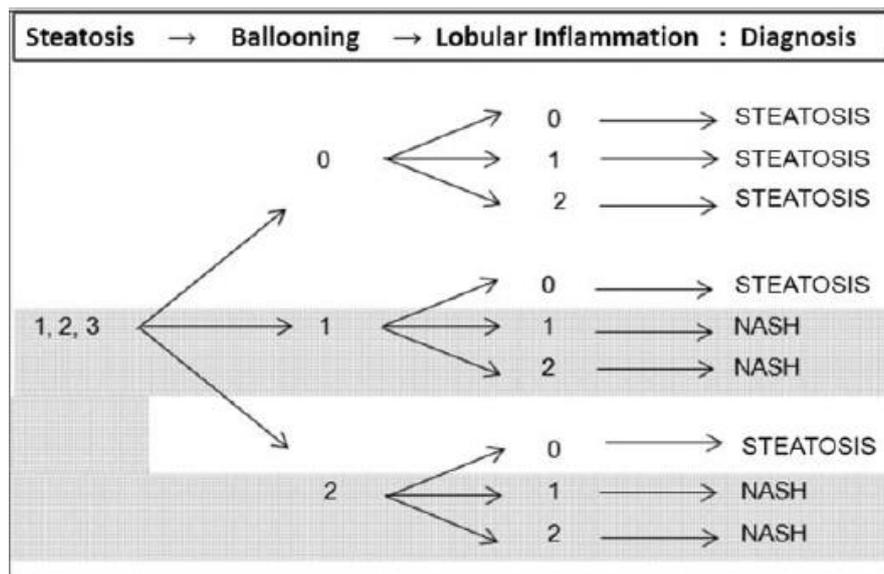


Figura 7. SAF Score<sup>(29)</sup>

Los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión que se describen en el siguiente apartado, fueron invitados a participar en el estudio y firmaron un consentimiento informado.

Este proyecto se llevó a cabo de acuerdo con los principios éticos para la investigación biomédica recogidos en la Declaración de Helsinki (en su última actualización de octubre de

2008), y siguiendo así mismo las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos propuestas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, 2002). Por último, y como confirmación de todo lo anterior, ya contamos con la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética de nuestro centro (Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla).

- ***Criterios de inclusión /exclusión***

**Criterios de inclusión:**

- Pacientes mayores de 18 años con EHmet confirmado por biopsia hepática.

**Criterios de exclusión:**

- Historia de consumo de alcohol de manera significativa.
- Hepatitis viral.
- Hepatitis autoinmune.
- Enfermedad metabólica (hemocromatosis, M. Wilson, deficiencia de alpha – 1 antitripsina).
- Medicación hepatotóxica (amiodarona).

Cuando los pacientes aceptan entrar en el estudio, y no más de 15 días tras la biopsia, se recoge la información del paciente (demográfica, clínica y bioquímica). Además, se obtienen muestras tanto de orina, como de sangre y la biopsia para ser procesadas en el laboratorio.

## **2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTAMINA/GLUTAMATO**

El protocolo del kit glutamina/glutamato de Promega (Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay) va a permitir medir los niveles de glutamina y glutamato que encontramos en suero de los pacientes. Para ello, primero habrá que preparar la muestra.

**Muestra:**

La muestra que vamos a utilizar es suero de los pacientes. El suero se tiene que diluir 1/50 en PBS. El volumen total de la dilución de la muestra será 150 µl, por eso, añadiremos 3 µl de muestra y 147 µl de PBS. Las muestras se cargarán en la placa por duplicado.

Curva patrón de glutamato:

En la placa, añadiremos también una curva patrón de glutamato para usar como control. Para ello, usaremos concentraciones de glutamato de 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 12.5  $\mu\text{M}$ , 6.25  $\mu\text{M}$ , 3.125  $\mu\text{M}$ , 1.56  $\mu\text{M}$ , 0.78  $\mu\text{M}$  y 0  $\mu\text{M}$ . El Glutamato del Kit de Promega tiene una concentración de 10  $\mu\text{M}$  por lo que para preparar la muestra de 50  $\mu\text{M}$  añadiremos 1  $\mu\text{l}$  de Glutamato y 199  $\mu\text{l}$  de PBS. Además, se añadirán 100  $\mu\text{l}$  de PBS en todos los Eppendorf restantes. De los 200  $\mu\text{l}$  de la concentración de 50  $\mu\text{M}$  se añaden 100  $\mu\text{l}$  al Eppendorf de 25  $\mu\text{M}$  y se diluye bien. Del Eppendorf de 25  $\mu\text{M}$  se cogen 100  $\mu\text{l}$  para añadirlos al Eppendorf de 12.5  $\mu\text{M}$  y así sucesivamente. La curva patrón también se cargará por duplicado.

El esquema de la placa es el siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	M1	M1	M1	M1	M2	M2	M2	M2	M3	M3	M3	M3
<b>B</b>	M4	M4	M4	M4	M5	M5	M5	M5	M6	M6	M6	M6
<b>C</b>	M7	M7	M7	M7	M8	M8	M8	M8	M9	M9	M9	M9
<b>D</b>	M10	M10	M10	M10	M11	M11	M11	M11	M12	M12	M12	M12
<b>E</b>	M13	M13	M13	M13	M14	M14	M14	M14	M15	M15	M15	M15
<b>F</b>	M16	M16	M16	M16	M17	M17	M17	M17	M18	M18	M18	M19
<b>G</b>	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0	M19	M19	M19	M19
	$\mu\text{M}$											
<b>H</b>	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0	M20	M20	M20	M20
	$\mu\text{M}$											

	Glutaminase Enzyme Solution
	Glutaminase Buffer

Preparación de los reactivos:

**Glutaminase Enzyme Solution (42 pocillos)**

Glutaminase Buffer 1050  $\mu\text{l}$

Glutaminase 5.25  $\mu\text{l}$

### ***Glutamate Detection Reagent (98 pocillos pocillos)***

<i>Luciferin Detection Solution</i>	4900 µl
<i>Reductase</i>	24.5 µl
<i>Reductase Substrate</i>	24.5 µl
<i>Glutamate Dehydrogenase</i>	98 µl
<i>NAD</i>	98 µl

Primero se añaden 25 µl de *Glutaminase Enzyme Solution* o *Glutaminase Buffer* según el pocillo correspondiente y después se añaden 25 µl de las muestras correspondientes en cada pocillo. Posteriormente se da una agitación y se incuba durante 30-40 minutos a temperatura ambiente.

Luego añadir 50 µl de *Glutamate Detection Reagent* en todos los pocillos y tras la agitación, incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Tras ese tiempo, leer la placa utilizando un lector de placas Infinite® 200 Pro.

### **3. DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICAS EN SCL1A3 Y SCL1A5**

El genotipado va a permitir analizar el ADN de los pacientes para conocer las bases específicas de nuestros SNP (single-nucleotide polymorphism) de interés. Para realizar el genotipado, primero se obtendrá el ADN de los pacientes partiendo de sangre total mediante MagNA Pure Compact Instrument (Roche).

Para el genotipado, necesitamos preparar en un Eppendorf la siguiente mezcla para añadir 9µl en cada pocillo de la placa.

Máster mix	5 µl/pocillo
Primers + sonda	0.25 µl/pocillo
H2O	3.75 µl

Además, en cada pocillo también se añadirá 1 µl de la muestra de ADN correspondiente. El volumen final será de 10 µl (9 µl de la mezcla + 1 µl de la muestra).

Los SNP elegidos son los siguientes:

- rs313853 (gen *SCLIA5*)
- rs2562582 (gen *SCLIA3*)

Se utilizará el kit FastStart Essential DNA Probes Master (Roche). Las placas que se utilizan son placas de 96 pocillos.

Las sondas utilizadas son TaqMan y se utiliza la PCR a tiempo real (QuantStudio1, ThermoFisher).

El protocolo que se utiliza tiene 40 ciclos de PCR.

#### **4. ANÁLISIS DEL MICROSATÉLITE EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN GLS**

La determinación del microsatélite en los pacientes fue realizada por el D. Antonio Gil Gómez. Para ello, se realizó una amplificación de la región de interés del promotor de GLS mediante PCR. Los amplicones obtenidos fueron separados por tamaño mediante electroforesis capilar.

#### **5. AISLAMIENTO DE CÉLULAS EPITELIALES HUMANAS DE ORINA**

Antes de comenzar con el protocolo de aislamiento de las células epiteliales, tenemos que preparar la solución de gelatina (Gelatina 1% PBS). Para conseguir 500 ml de la solución de Gelatina 1% PBS, tenemos que utilizar 5g de gelatina y 500 ml de PBS. Posteriormente, se tiene que autoclavar durante 30 minutos y conservar la solución a temperatura ambiente (RT).

También hay que preparar los medios que se van a utilizar:

1. El **medio D10** (500 ml), que está compuesto por:
  1. 445 ml de DMEN high glucose
  2. 50 ml FBS (Fetal Bovine Serum)
  3. 5 ml de GPS 100x (Penicilin, Streptomycin, Glutamine 100x)
2. El **medio K** (500 ml), que contiene:
  1. 395 ml de EBM-2 (Endothelial Basal Medium)
  2. 100 ml de FBS
  3. 5 ml de GPS 100x

4. Alícuotas: 10ml FBS, 2 ml hFGF-B, 0.5 ml VEGF, 0.5 ml R3-IGF-1, 0.5 ml ascorbic acid, 0.5 ml hEGF, 0.5 ml GA-1000, 0.5 ml Heparin
5. Posteriormente, hay que filtrarlo mediante el Sterilcup.

Ambos medios se tienen que conservar a 4°C y hay que calentarlos a 36°C antes de utilizarlos.

Para la obtención de células epiteliales utilizaremos placas de 6 pocillos que hay que tratar con 2 ml de gelatina al menos durante 10-15 minutos a 37°C.

Para el aislamiento de las células epiteliales, necesitaremos al menos 50 ml de muestra de orina en un envase estéril y se tiene que mantener en frío hasta su uso.

Tras alicuotar la muestra, hay que centrifugar los falcon a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Eliminamos el sobrenadante y se resuspende el pellet en 10 ml de medio D10 para volver a centrifugar en las mismas condiciones (1500 rpm, 10 minutos, RT).

Finalmente, tras eliminar el sobrenadante, se resuspende el pellet en medio K, que es un medio de aislamiento de células progenitoras. Por cada 50 ml de muestra de orina, se resuspende en 2 ml de medio K y se siembra en 1 pocillo de la placa p6.

Se tiene que cambiar el medio K cada 2 días. Tras 7-14 días comenzarán a aparecer colonias de células epiteliales.

## **6. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES**

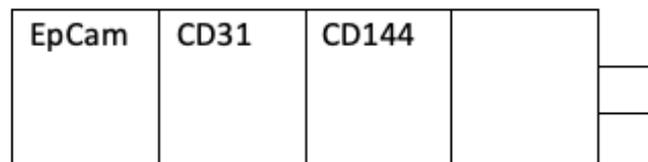
Cuando las células ya han crecido, vamos a caracterizarlas, para comprobar que son células epiteliales. Para ello usaremos diferentes marcadores y realizaremos inmunocitoquímica. Vamos a utilizar EpCam – FITC, CD31 – FITC y CD144 – FITC, todos ellos marcadores de superficie. Además, utilizaremos DAPI para teñir el núcleo. Para la inmunocitoquímica, se van a utilizar células epiteliales obtenidas de la orina de pacientes con EHmet y células endoteliales (ECFC) de cordón umbilical para usarlas como control negativo. Ambas son cultivos primarios aislados en el laboratorio.

La tinción se va a realizar en cámaras de cultivo de 4 pocillos [4 Chamber Polystyrene Vessel Tissue Culture Treated Glass Slide (354104 / 354114)] para optimizar el uso de los anticuerpos.

El primer día descongelaremos las células epiteliales de pacientes y las ECFCs de cordón umbilical y las sembraremos en una placa previamente gelatinizada y les cambiaremos el medio cada dos días.

Una vez que las células estén confluyentes, retiraremos el medio y lavaremos durante 10 minutos con PBS. Luego, añadiremos PFA 4% durante 20 minutos para fijar las células de la placa. Tras ese tiempo retiramos el PFA 4% y lavamos 3 veces con PBS. Prepararemos PBS-BSA a 0,1% (10 ml PBS + 0,01g BSA). Añadiremos 200 µl en cada pocillo y lo dejamos 1 hora en agitación, para evitar uniones inespecíficas.

Para preparar los anticuerpos fluorescentes, añadiremos 400 µl de PBS junto con 6 µl del anticuerpo correspondiente (3:200). Los anticuerpos utilizados son EpCam (Invitrogen Anti-Human CD326 Alexa Fluor 488 (53832642)), CD144, (Miltenyi BioTec VE-Cadherin FITC Human (130100742)) y CD31 (BD FITC Mouse Anti-Human CD31 (55445)). Se tienen que dejar durante toda la noche a 4°C en agitación. El esquema de anticuerpos conjugados que vamos a utilizar es el siguiente:



**Figura 8.** Esquema de la distribución de los anticuerpos.

Después, se retira la solución y se lava el exceso 3 veces con PBS. Añadimos DAPI (Invitrogen Termo Fisher Science (D21490)). Para preparar la solución de DAPI (1:1000), añadimos 2 µl de DAPI en 2000 µl de PBS. Se añade a la placa y se deja 10 minutos para lavar 3 veces con PBS. Finalmente, montamos el porta para observarlo al microscopio con el medio de montaje [VectaMount Permanent Mounting Medium].

## **7. REPROGRAMACIÓN**

### ***Placas de Matrigel:***

Primero hay que descongelar un vial de BD Matrigel™ (10 ml) en hielo overnight (ON). Los 10 ml de BD Matrigel™ se tienen que mezclar con 20 ml de KnockOut DMEM frío, trabajando siempre en hielo. Finalmente, se alícuota 1 ml en falcon de 50 ml y se guarda a -20°C hasta su uso.

Justo antes de tratar las placas con Matrigel, descongelar una alícuota de 1 ml en hielo y añadir 29 ml KnockOut DMEM frío. Tras mezclar bien, añadir el Matrigel en las placas rápidamente y repartir homogéneamente por toda la placa. Finalmente, hay que incubar la placas a RT al menos 1 hora antes de su uso. Si la placa no se va a usar inmediatamente, se tiene que sellar con Parafilm y guardarla a 4°C máximo 14 días.

Antes del uso de la placa, se elimina el exceso de Matrigel y no se lava la placa.

#### ***Preparación de las células para la transfección:***

Cuando las células epiteliales estén al 80% de la placa p10, se levantan para poder transfectarlas. Para ello, se tiene que retirar el medio y lavar la placa con PBS. Usando tripsina, se despegan las células de la placa y tras contrarrestar la tripsina con medio D10, se cuentan las células. Por cada reacción se necesitarán 800.000 células.

Tras centrifugar las células (1500 rpm; 5 min; RT), eliminar el sobrenadante y lavar las células con PBS. Volver a centrifugar en las mismas condiciones (1500 rpm; 5 min; RT).

Tras esta centrifugación, es recomendable eliminar el sobrenadante al máximo.

#### ***Preparación de los materiales para la transfección:***

1. En las placas de p6, se añade medio K sin antibiótico para tenerlo preparado para la transfección, así las células sufren menos.
2. El electroporador que vamos a utilizar es Invitrogen™ Neon™ Transfection System. En la cubeta del aparato negro donde va a entrar la punta con las células, hay que añadir 3 ml de Buffer electrolito (Buffer E). Tras rellenar la cubeta, insertarla en el aparato.

#### ***Transfección:***

Tras eliminar bien el PBS (sobrenadante) de las células centrifugadas, resuspendemos las células en 30µl de Buffer E (15 µl por cada reacción) y hacemos dos transfecciones: a) control sin plásmido y b) células con el plásmido a 1µg/µl.

Cuando ya están las células preparadas para electroporar, se enciende el electroporador y se programa a 1200v, 15 ms, 4x. Con la punta, se cogen 10 µl de la condición control, se introduce

la pipeta en el tubo Neón y se da el pulso. Tras el pulso se siembran las células inmediatamente en las placas p6 previamente preparadas con medio K sin antibiótico.

Se tiene que repetir el mismo proceso para la condición con el plásmido.

Tras un día en medio K sin antibióticos, añadir el medio K completo. Se tiene que renovar el medio K cada 48 horas.

El día 3 tras la transfección, se empezará a utilizar el medio de reprogramación ReproTeSR Basal Medium, cambiando el medio cada 2 días.

### ***Feeding cells:***

Las feeding cells son células embrionarias irradiadas que se usan para dar soporte a las células transfectadas, las sembraremos en las placas tratadas con matrigel y las dejaremos 48 horas en K-Medium para posteriormente añadir las células transfectadas y co-cultivarlas con las feeding en medio ReproTeSR. Se levantan las células transfectadas y se co-cultivan con las feeding cells utilizando medio de reprogramación (ReproTeSR Basal Medium). El medio se cambia cada 48 horas hasta que comiencen a aparecer las colonias de iPSCs. Suelen tardar unas 2 semanas aproximadamente.

## **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Para analizar si las variables siguen una distribución normal se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov. El test T-student fue usado para comparar las variables con distribución normal y el test U-Mann Whitney para las variables no paramétricas. Para comparar las variables cualitativas se usó el test de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Los datos se compararon y analizaron mediante el software SPSS (versión 22.0; SPSS, Chicago, IL) y GraphPad Prism (versión 6.0; GraphPad Software, La Jolla, CA) fue usado para realizar los gráficos. Para todos los análisis, el valor de  $p < 0.05$  fue considerado como estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### 1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES

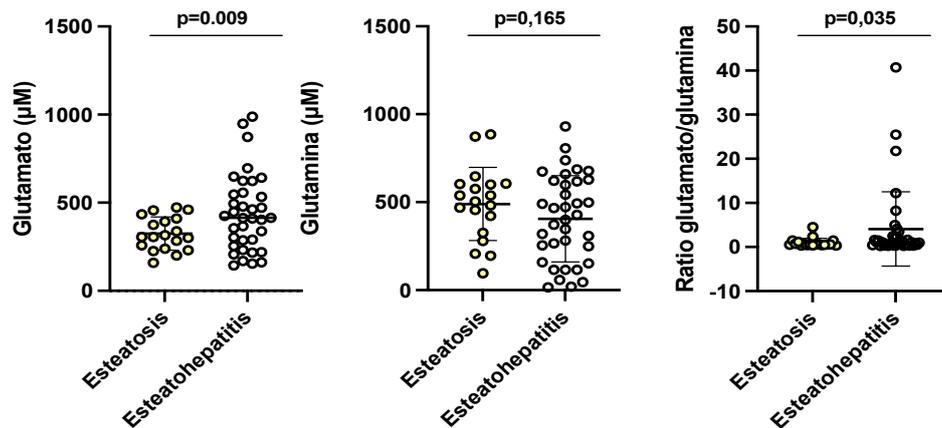
Se incluyeron 60 pacientes en el estudio y se clasificaron según el SAF-score, siendo 28 de ellos esteatohepatitis y 22 esteatosis. Los 5 restantes no pudieron ser clasificados por faltar información referente a los datos de actividad de la biopsia hepática. Las características clínicas de los pacientes se encuentran resumidas en la Tabla 1. El porcentaje de mujeres en nuestro estudio es de 53,3%, es decir, 32 son mujeres y la media de edad es de  $55,1 \pm 11,3$ .

Si analizamos los pacientes en base a la fibrosis, 14 (23,3%) tendrán F0, es decir, no tienen fibrosis. 14 (23,3%) pacientes tienen F1, 10 (16,7%) de los pacientes tienen F2, 12 (20%) tienen F3 y 9 (15%) son F4.

<b>Tamaño muestral</b>	60
<b>Mujeres (%)</b>	53,3% (32)
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	35,0 $\pm$ 7,3
<b>Edad</b>	55,1 $\pm$ 11,3
<b>GGT (mg/dl)</b>	90,6 $\pm$ 114,5
<b>AST (U/L)</b>	46,9 $\pm$ 27,3
<b>ALT (UI/L)</b>	55,8 $\pm$ 38,0
<b>Fibrosis</b>	
- <b>F0; %, (n)</b>	23,3% (14)
- <b>F1; %, (n)</b>	23,3% (14)
- <b>F2; %, (n)</b>	16,7% (10)
- <b>F3; %, (n)</b>	20% (12)
- <b>F4; %, (n)</b>	15% (9)
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	186,0 $\pm$ 40,3
<b>HOMA</b>	7,3 $\pm$ 6,0
<b>Hipertensión arterial (HTA)%, (n)</b>	63,3% (38)
<b>Diabetes tipo II %, (n)</b>	58,3% (35)
<b>Cirrosis %, (n)</b>	10% (6)
<b>Esteatohepatitis</b>	46,7% (28)

**Tabla 1.** Características basales de los pacientes. Los datos se expresan con la media  $\pm$  SD para las variables cuantitativas y como %(n) para las variables cualitativas. IMC: índice de masa corporal, AST: aspartato aminotransferasa, ALT: alanina aminotransferasa; GGT: gamma glutamil transpeptidasa

## 2. NIVELES DE GLUTAMATO, GLUTAMINA Y RATIO GLUTAMATO/GLUTAMINA EN ESTEATOSIS VS ESTEATOHEPATITIS

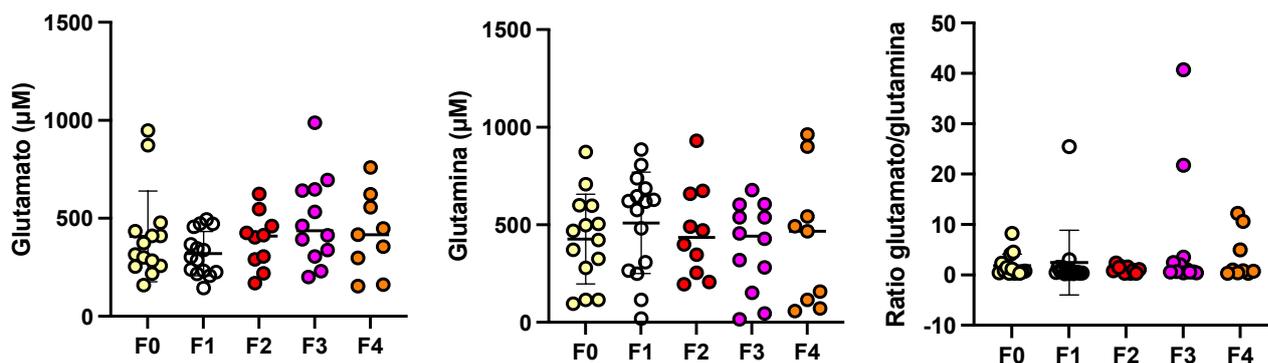


**Figura 9.** Niveles de glutamato, glutamina y el ratio Glu/Gln según el grupo de pacientes (esteatosis vs esteatohepatitis)

En la Figura 9 se representan los niveles de glutamato, glutamina y el ratio glutamato/glutamina en los dos grupos de estudio (esteatosis y esteatohepatitis). En el caso de los niveles de glutamato, podemos observar un aumento estadísticamente significativo en los niveles en el grupo de esteatohepatitis frente al grupo de esteatosis, con un  $p=0,09$ . En cuanto al ratio Glutamato/Glutamina, también se ve un aumento del ratio de esteatohepatitis frente a esteatosis, con una  $p=0,035$ , es decir, estadísticamente significativo. En cambio, en cuanto a los niveles de glutamina, no se observaron diferencias.

## 3. NIVELES DE GLUTAMATO, GLUTAMINA Y RATIO GLUTAMATO/GLUTAMINA EN FUNCIÓN DE FIBROSIS

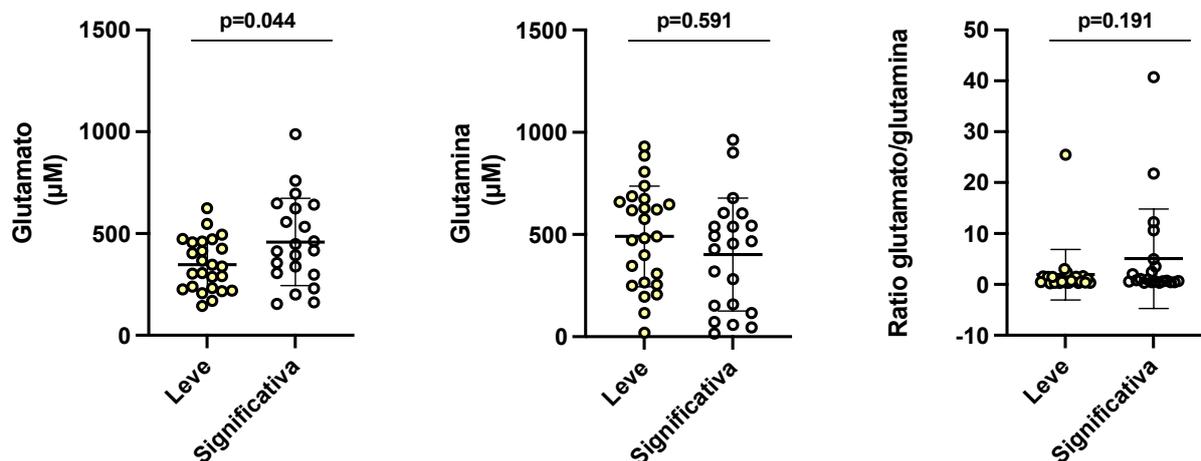
Los pacientes también se clasificaron en función de la fibrosis presentada en la biopsia. Como ya hemos mencionado, 14 de los pacientes tenían un estadio de F0, 14 F1, 10 F2, 12 F3 y 9 F4.



**Figura 10.** Niveles de glutamato, glutamina y el ratio Glu/Gln según el estadio de fibrosis.

Como se puede ver en la Figura 10, no hay diferencias significativas en los estadios de fibrosis en los niveles de glutamato, niveles de glutamina o ratio glutamato/glutamina.

Por ello, agrupamos la fibrosis en dos grupos: leve o significativa. En la fibrosis leve se incluye los estadios F0, F1 y F2 mientras que la fibrosis significativa agrupa los pacientes con estadios F3 y F4. Tenemos 25 pacientes con fibrosis leve (F0-F1) y 21 pacientes con fibrosis significativa ( $\geq$ F2).



**Figura 11.** Niveles de glutamato, glutamina y el ratio Glu/Gln en función de fibrosis leve o significativa.

Los niveles de glutamato están aumentados de manera significativa ( $p=0,044$ ) en el grupo de fibrosis significativa. En el caso de los niveles de glutamina, están aumentados en el grupo de

fibrosis leve, aunque no es estadísticamente significativo ( $p=0,591$ ). En cuanto al ratio Glu/Gln, está aumentando en el grupo de fibrosis significativa, aunque los resultados obtenidos no sean estadísticamente significativos.

#### 4. ESTUDIOS DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN SLC1A3 Y SLC1A5, EN PACIENTES EHMET Y SU CORRELACIÓN CON LOS NIVELES DE GLUTAMINA-GLUTAMATO SOLUBLES EN SUERO

También hemos analizado la relación que hay entre los niveles de glutamato, glutamina y el ratio Glu/Gln con la presencia de un alelo mutado (C), en el gen *SLC1A5* y el gen *SLC1A3*.

En el gen *SLC1A3* no hay datos significativos en los niveles de glutamina, glutamato ni el ratio glutamato/glutamina, en los distintos grupos de pacientes (CC, CT o TT) (Tabla 2) ni tampoco tenemos datos significativos en relación con los niveles de glutamato, glutamina o el ratio glutamato/glutamina en base a la presencia del alelo mutado (C) (Tabla 3).

##### *SLC1A3*

	<i>CC (n=1)</i>	<i>CT (n=11)</i>	<i>TT (n=45)</i>	<i>Significancia</i>
<b>Glutamato (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	254	427.7 $\pm$ 167,4	390,5 $\pm$ 195,9	p =0,642
<b>Glutamina (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	598	354,6 $\pm$ 253,9	449,2 $\pm$ 233	p =0,389
<b>Ratio glutamato/glutamina</b>	0,4	2,7 $\pm$ 3,5	3,1 $\pm$ 7,5	p =0,927

**Tabla 2.** Niveles de glutamato, glutamina y ratio glutamato/glutamina en relación con *SLC1A3*.

	<i>CC/CT (n=12)</i>	<i>TT (n=45)</i>	<i>Significancia</i>
<b>Glutamato (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	413,2 $\pm$ 167,3	390,5 $\pm$ 195,9	p =0,995

<b>Glutamina (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	450 $\pm$ 233	374,8 $\pm$ 252	p=0,926
<b>Ratio glutamato/glutamina</b>	2,6 $\pm$ 3,4	3,1 $\pm$ 7,5	p=0,822

**Tabla 3.** Niveles de glutamato, glutamina y ratio glutamato/glutamina en relación con la presencia del alelo mutado en el gen *SLC1A3*.

En el gen *SLC1A5* tampoco hay datos significativos en los niveles de glutamina, glutamato ni en el ratio glutamato/glutamina, en los distintos grupos de pacientes (Tabla 4). Además, tampoco hay datos estadísticamente significativos en relación con los niveles de glutamato, glutamina y ratio glutamato/glutamina en base a la presencia del alelo mutado (C) (Tabla 5).

### *SLC1A5*

	<i>CC (n=4)</i>	<i>CT (n=26)</i>	<i>TT (n=27)</i>	<i>Significancia</i>
<b>Glutamato (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	237,7 $\pm$ 31,4	426,8 $\pm$ 192,1	388,2 $\pm$ 191,1	p=0,172
<b>Glutamina (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	604,7 $\pm$ 50,8	460,5 $\pm$ 252,5	383,5 $\pm$ 226,7	p=0,164
<b>Ratio glutamato/glutamina</b>	0,4 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 2,7	4,3 $\pm$ 9,5	p=0,327

**Tabla 4.** Niveles de glutamato, glutamina y ratio glutamato/glutamina en relación con *SLC1A5*.

	<i>CC/CT (n=30)</i>	<i>TT (n=27)</i>	<i>Significancia</i>
<b>Glutamato (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	401,6 $\pm$ 190,2	388,2 $\pm$ 191,1	p=0,793
<b>Glutamina (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	479,7 $\pm$ 240,2	383,5 $\pm$ 226,7	p=0,127
<b>Ratio glutamato/glutamina</b>	1,7 $\pm$ 2,6	4,3 $\pm$ 9,5	p=0,149

**Tabla 5.** Niveles de glutamato, glutamina y ratio glutamato/glutamina en relación con la presencia del alelo mutado en el gen *SLC1A5*.

## 5. ESTUDIO/DETERMINACIÓN DEL MICROSATÉLITE DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN GLS Y SU CORRELACIÓN CON LOS NIVELES DE GLUTAMATO-GLUTAMINA SOLUBLES EN SUERO

En primer lugar, se analizaron los microsatélites con la severidad de la patología y observamos que el 88,9% de los pacientes con esteatosis eran portadores de al menos un alelo largo, mientras que solo el 53.1% de los pacientes con esteatohepatitis tenían al menos un alelo largo ( $p=0,010$ ).

	<b>Esteatosis (n=18)</b>	<b>Esteatohepatitis (n=32)</b>
<i>Sin alelo largo</i>	2 (11,1%)	15 (46,9%)
<i>Al menos un alelo largo</i>	16 (88,9%)	17 (53,1%)

**Tabla 6.** Presencia de al menos un alelo largo en microsatélites en función de la severidad de la patología.

Además, observamos también que el 69,2% (n=18) de los pacientes con menor porcentaje de esteatosis (6-33%) tenían al menos un alelo largo, un 82,4% (n=14) de los que tenían entre un 34 y un 66% de esteatosis y un 25% (n=2) de los que tenían esteatosis >66%, siendo esta diferencia significativa ( $p=0,016$ ). Esto quiere decir que la presencia de al menos un alelo largo era mayor en aquellos pacientes con menos grasa hepática.

	<b>6-33% (n=26)</b>	<b>34-66% (n=17)</b>	<b>&gt;66% (n=8)</b>
<i>Sin alelo largo</i>	8 (30,8%)	3 (17,6%)	6 (75%)
<i>Al menos un alelo largo</i>	18 (69,2%)	14 (82,4%)	2 (25%)

**Tabla 7.** Presencia de al menos un alelo largo en microsatélites en función del grado de esteatosis

Además, quisimos analizar la presencia de al menos un alelo largo con el grado de ballooning y observamos una tendencia similar a la anterior. El porcentaje de pacientes que tenía al menos un alelo largo era menor en aquellos pacientes con balonización marcada (64,3%, n=9) que en aquellos pacientes sin balonización (100%, n=11),  $p=0,024$ .

	<b>Ninguna (n=11)</b>	<b>Leve (n=26)</b>	<b>Marcada (n=14)</b>
<i>Sin alelo largo</i>	0 (0%)	12 (46,2%)	5 (35,7%)
<i>Al menos un alelo largo</i>	11 (100%)	14 (53,8%)	9 (64,3%)

**Tabla 8.** Presencia de al menos un alelo largo en microsatélites en función del ballooning.

Respecto a la inflamación, no observamos diferencias significativas entre la presencia de al menos un alelo largo y tener mayor grado de inflamación. Lo mismo ocurre en la fibrosis, ya que no hay ningún dato estadísticamente significativo.

Al analizar los niveles de glutamato, glutamina y el ratio glutamato/glutamina en función de la presencia de al menos un alelo largo, no obtuvimos diferencias significativas, aunque se aprecia una tendencia en el ratio glutamato/glutamina que no alcanzó la significación estadística.

	<i>Sin alelo largo</i>	<i>Al menos un alelo largo</i>	<i>Significancia</i>
<b>Glutamato (μM)</b>	400,9±182,5	377,6 ±191,7	p=0,996
<b>Glutamina (μM)</b>	476,8±171,2	432 ±258,6	p=0,459
<b>Ratio glutamato/glutamina</b>	1,1±0,95	2,9±5,8	p=0,08

**Tabla 9.** Presencia de al menos un alelo largo en microsatélites en función de los niveles de glutamato, glutamina y ratio glutamato/glutamina.

Posteriormente, analizamos la presencia de tener dos alelos largos, y como se representa en la siguiente tabla, observamos que el 38,9% de los pacientes con esteatosis y el 12,5% de los pacientes con esteatohepatitis presentaban los dos microsatélites largos (p=0,037) (Tabla 10). En cuanto al ballooning, esteatosis, inflamación y fibrosis (Tabla 11), no se observan diferencias significativas.

	<b>Esteatosis (n=18)</b>	<b>Esteatohepatitis (n=32)</b>
<i>Sin alelo largo-largo (n=39)</i>	11 (61,1%)	28 (87,5%)
<i>Largo-largo (n=11)</i>	7 (38,9%)	4 (12,5%)

**Tabla 10.** Presencia de dos alelos largos en microsatélites en función de la severidad de la patología.

	<b>F0 (n=13)</b>	<b>F1 (n=14)</b>	<b>F2 (n=10)</b>	<b>F3 (n=10)</b>	<b>F4 (n=5)</b>
<i>Sin alelo largo-largo</i>	11 (84,6%)	10 (71,4%)	7 (70%)	7 (70%)	5 (100%)
<i>Largo-largo</i>	2 (15,4%)	4 (28,6%)	3(30%)	3(30%)	0 (0%)

**Tabla 11.** Presencia de dos alelos largos en microsatélites en función de la fibrosis

Si se analiza la concentración de glutamato, glutamina y el ratio glutamato/glutamina, tampoco obtenemos resultados estadísticamente significativos.

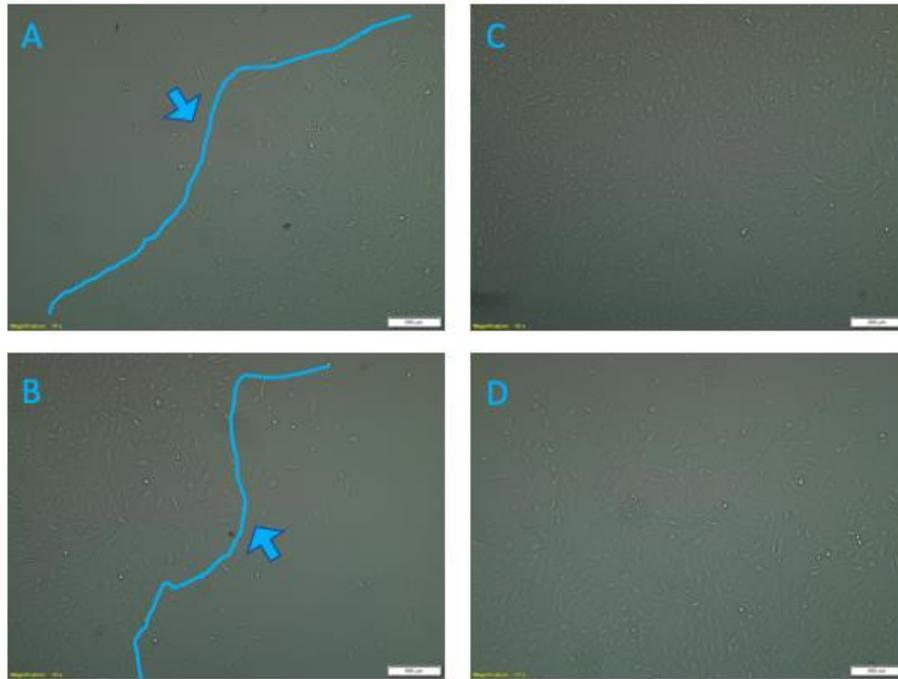
	<i>Sin alelo largo-largo</i>	<i>Largo-largo</i>	<i>Significancia</i>
<b>Glutamato (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	387,5 $\pm$ 186,9	379,6 $\pm$ 195,9	p=0,615
<b>Glutamina (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	463,9 $\pm$ 235,7	392,8 $\pm$ 216,5	p=0,781
<b>Ratio glutamato/glutamina</b>	1,6 $\pm$ 1,15	1,3 $\pm$ 0,9	p=0,347

**Tabla 12.** Presencia de dos alelos largos en microsatélites en función de los niveles de glutamato, glutamina y ratio glutamato/glutamina.

## **6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS EPITELIALES A PARTIR DE ORINA DE PACIENTES**

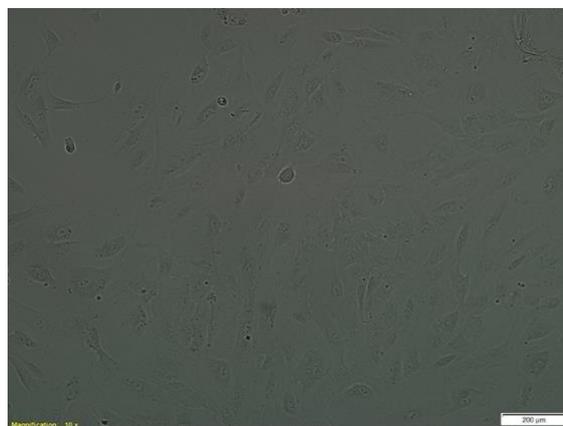
En la figura 12 podemos observar una colonia de células epiteliales que ha crecido tras diez días en cultivos en placas gelatinizadas al 10% a partir de 50 ml de orina de un paciente EHmet. Durante los meses de marzo a mayo se sembraron un total de 15 orinas, obteniendo células en 5 de ellas. Además, hubo 10 pacientes de los cuales no pudimos obtener células epiteliales. La imagen está tomada con un aumento del 10X al microscopio invertido Olympus IX-71. En las imágenes podemos ver:

- A) y B) el borde de la colonia de células epiteliales
- C) y D) el centro de la colonia, donde se aprecian las células más confluentes.



**Figura 12.** Colonia de células epiteliales al microscopio visto en contraste de fases (10X).

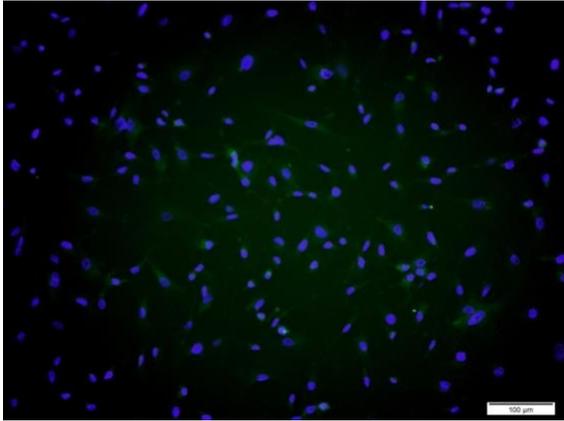
Además, podemos observar las células también a un aumento 20X.



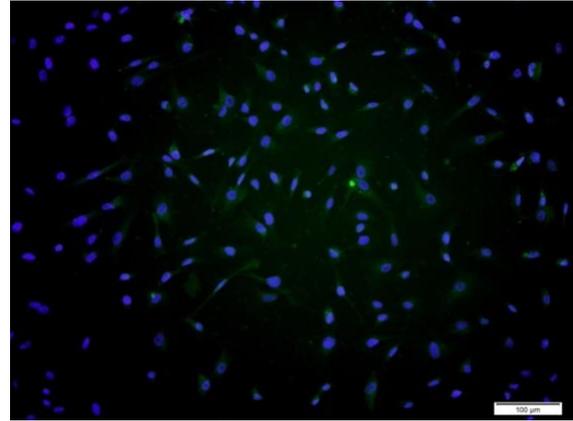
**Figura 13.** Células epiteliales al microscopio 20X.

## **7. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES**

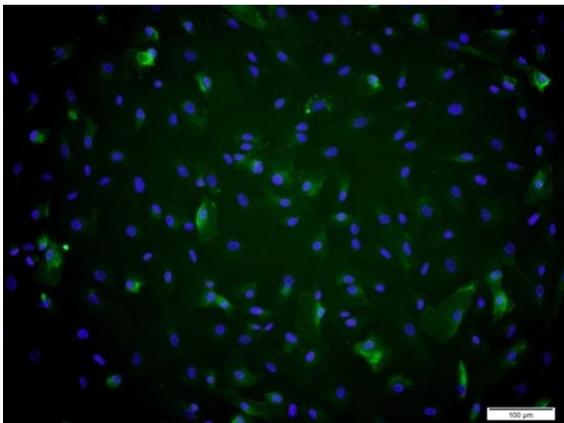
Las células epiteliales van a ser positivas para EPCAM y negativas para CD31 y CD144, mientras que las células endoteliales de cordón umbilical son positivas para CD31 y CD144 y negativas para EPCAM. Las fotos están tomadas al microscopio de fluorescencia (Microscopio directo Olympus BX – 61).



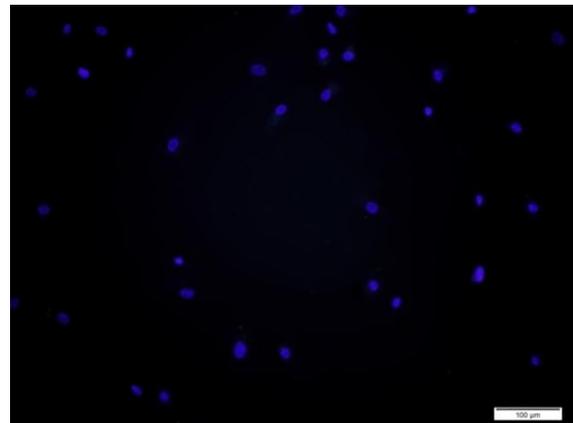
**Figura 14.** ECFCs CD31+/DAPI+ al microscopio de fluorescencia con aumento 10X.



**Figura 15.** ECFCs CD144+/DAPI+ al microscopio de fluorescencia con aumento 10X.

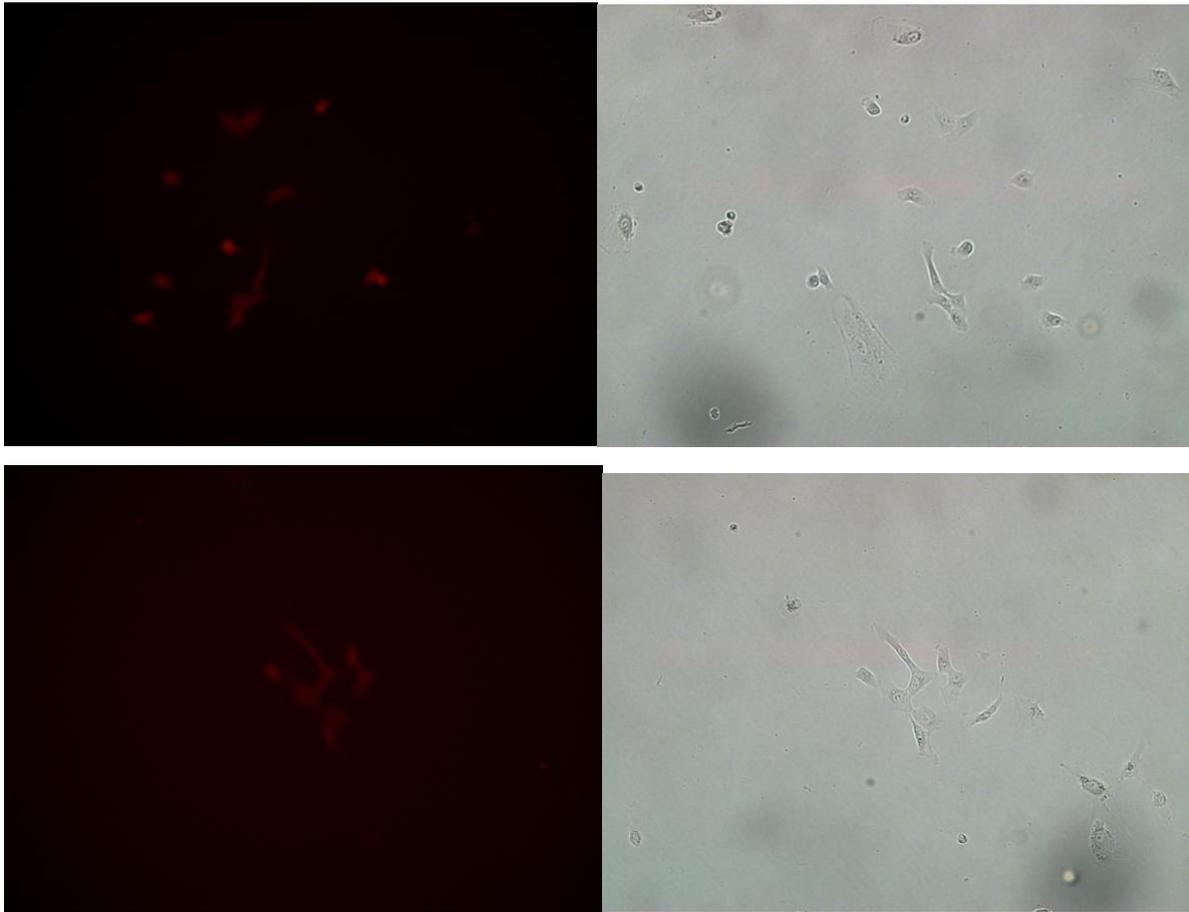


**Figura 16.** Células epiteliales EpCam+/DAPI+ al microscopio de fluorescencia con aumento 20X.



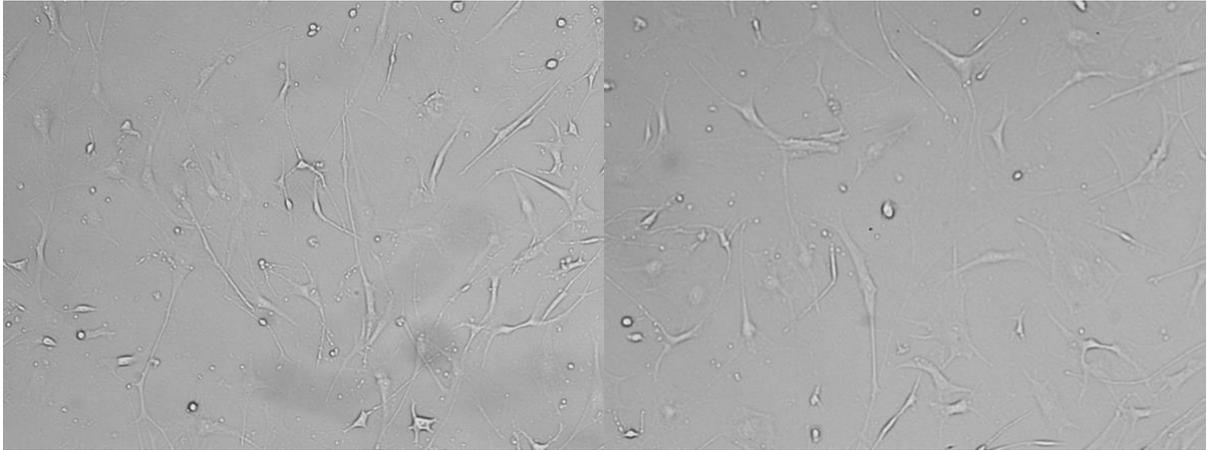
**Figura 17.** Células epiteliales CD31 - / DAPI + al microscopio de fluorescencia con aumento 10X.

## 8. DESDIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES A iPSCs

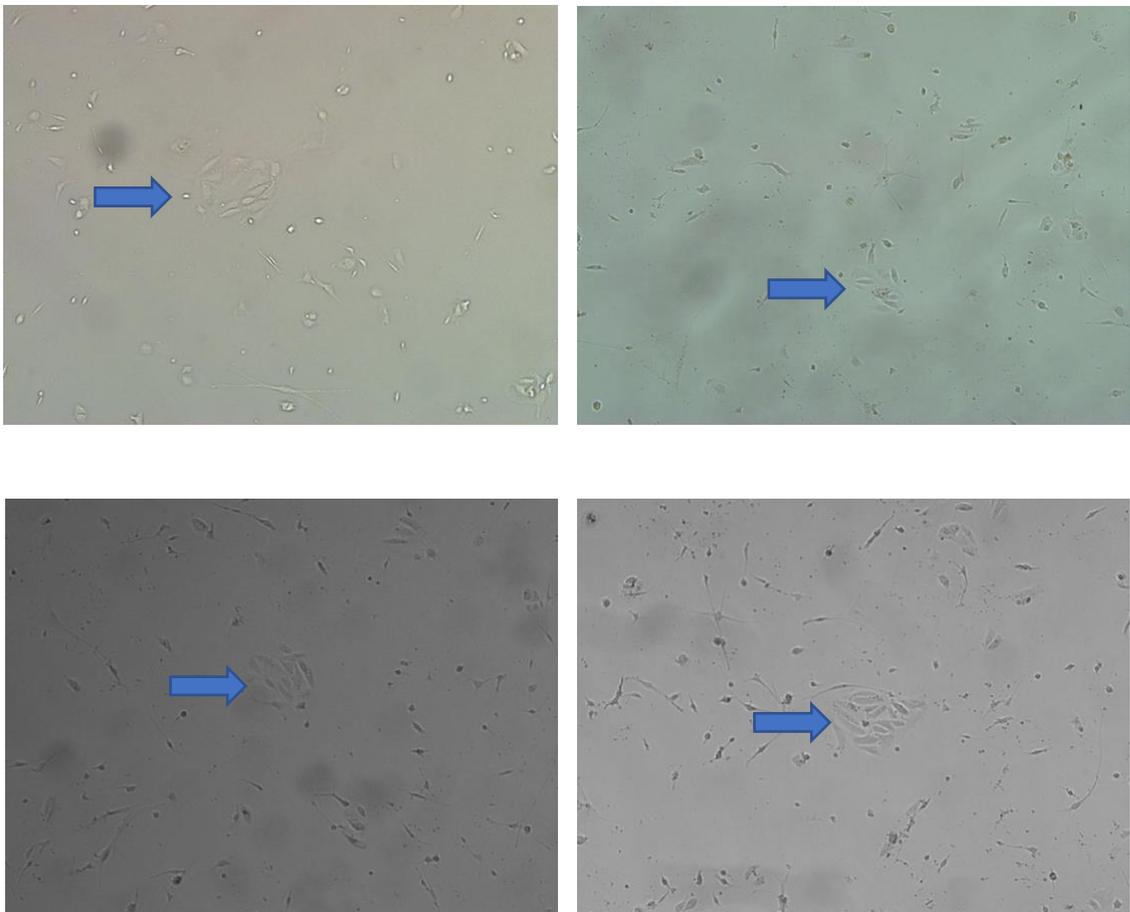


**Figura 18.** Células transfectadas tras 72 horas del proceso de transfección.

En la figura 18 podemos observar el plásmido dentro de las células. El plásmido está marcado con el marcador con tdTomato, por lo que las células que hayan adquirido el plásmido en su núcleo estarán marcadas de rojo. Además, se observa que el marcaje rojo coincide con células que se observan al microscopio de contraste de fases. Esto quiere decir, que el marcaje rojo no es del fondo, sino que corresponde a una célula.

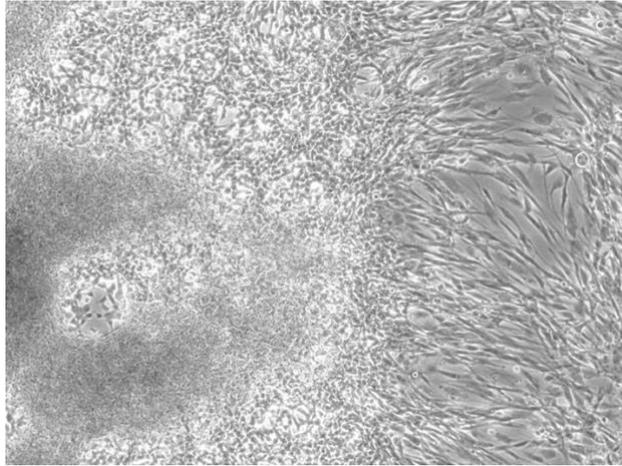


**Figura 19.** Células transfectadas tras 7 días en cultivo.



**Figura 20.** Células transfectadas tras 21 días en cultivo.

En la Figura 20 podemos apreciar el estadio pre-iPSCs, último estadio previo a tener las iPSCs. En este punto, levantamos las células y las pasamos a una nueva placa para favorecer el crecimiento y la expansión de la colonia.

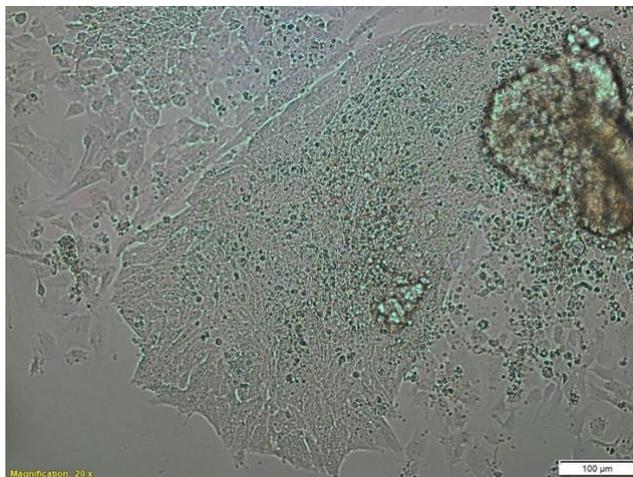


**Figura 21.** Colonias de iPSCs previa al aislamiento.

En la Figura 21 se pueden observar las colonias de iPSCs obtenidas. Estas células estarían listas para levantar y sembrarlas en otra placa (p24) para que sigan creciendo.



**Figura 22.** Colonia de iPSCs tras aislamiento en otra placa (p24) (10X)



**Figura 23.** Colonia de iPSCs aislamiento en otra placa (p24) (20X)

En las Figuras 22 y 23 podemos observar una colonia de iPSCs tras su aislamiento.

## DISCUSIÓN

La esteatosis hepática metabólica (EHmet) aun teniendo una prevalencia del 25% de la población, no tiene tratamiento farmacológico aprobado<sup>(1)</sup>. Los cambios en el estilo de vida es la opción terapéutica que existe hoy en día. Por ello, sería interesante buscar nuevas dianas farmacológicas para poder desarrollar algún tratamiento eficaz.

La glutaminólisis, procedimiento por el cual se obtiene glutamato y amonio a partir de glutamina, puede ser una nueva diana terapéutica para los pacientes EHmet<sup>(11)(12)</sup>. Se ha relacionado la glutaminólisis con la fibrosis y la esteatosis. Existen dos tipos de isoformas de la glutaminasa: GLS1 y GLS2. La GLS2 es la principal enzima en el hígado, mientras que la GLS1 tiene una distribución más ubicua, siendo su localización principal los riñones. Se ha visto que en pacientes con cirrosis o cáncer hepático, se produce un cambio metabólico y GLS1 pasa a ser la isoforma más predominante en el hígado<sup>(14)(15)</sup>.

Simon et al, demostraron que GLS1 estaba relacionada con la esteatosis en EHmet ya que si se inhibía dicha enzima en un modelo deficiente en colina y metionina, se restauraba la síntesis y exportación de los triglicéridos VLDL, reduciendo así la esteatosis hepática<sup>(15)</sup>.

Además, la glutaminólisis también se ha relacionado con la fibrosis. La activación de las células hepáticas estrelladas es importante en la generación de fibrosis y la glutaminólisis es determinante para la reprogramación metabólica necesaria que tienen que ocurrir en las células. La glutaminólisis permitirá el cumplimiento de la alta demanda bioenergética que tienen las HSC activadas. Además, inhibiendo la glutaminólisis, se ha visto que se reduce la acumulación de miofibroblastos<sup>(14)</sup>.

Para continuar trabajos previos realizados en nuestro grupo analizamos los niveles séricos de glutamina, de glutamato y el ratio glutamato/glutamina para relacionarlos con distintos aspectos de la enfermedad. Vimos que había una relación significativa de los niveles de glutamato y ratio de glutamato/glutamina en esteatosis vs esteatohepatitis. Los valores tanto del nivel de glutamato como del ratio glutamato/glutamina están aumentados en los pacientes con esteatohepatitis. Simon et al demostraron que había una sobreexpresión de GLS1 tanto a nivel proteico como a nivel de ARNm en pacientes con esteatohepatitis frente a controles sanos<sup>(15)</sup>,

por lo que nuestros resultados estarían en consonancia con los resultados obtenidos en dicho artículo. Además, en la inmunohistoquímica realizada en tejido de ratón en nuestro laboratorio, se observaba el aumento de GLS1 en esteatohepatitis.

Además, aunque no obtengamos datos significativos estratificando los pacientes por el grado de fibrosis, si se clasifican en fibrosis leve frente a fibrosis significativa, observamos que los pacientes con fibrosis significativa tienen los niveles de glutamato aumentados de manera significativa. Estos resultados están relacionados con los obtenidos por Du et al, ya que vieron que los hígados que tenían mayor grado de fibrosis disminuían la concentración de glutamina y aumentaba la concentración de glutamato en comparación con hígados no fibróticos<sup>(20)</sup>.

En el caso de los SNPs estudiados, no obtenemos datos significativos, por lo que no encontramos asociación entre los genes *SLCIA3* y *SLCIA5* y la severidad de la patología.

Posteriormente, analizando la relación de la longitud de las repeticiones del microsatélite del gen *GLS* con distintas características de la enfermedad, nos encontramos con una relación significativa entre la presencia de al menos un alelo largo con la severidad de la patología. Se observó que los pacientes que no tenían al menos un alelo largo, eran del grupo de esteatohepatitis predominantemente. Además, si se analiza la presencia de al menos un alelo largo en relación con la esteatosis, se observa que en pacientes con menos grasa hepática hay más presencia de al menos un alelo largo. Según Kuilenburg et al, la presencia de una expansión larga de tripletes produce una disminución de la transcripción de *GLS*<sup>(30)</sup>, por lo que disminuirá la actividad de la enzima, avanzando menos en la enfermedad. Por eso, aquellos pacientes que no tienen alelos largos tienen un mayor avance de la enfermedad, llegando al estadio de esteatohepatitis.

Luego, estudiamos la relación que tiene el microsatélite con el ballooning y vimos que el porcentaje de los pacientes con balonización marcada era menor entre los pacientes con al menos un alelo largo en comparación con los pacientes sin balonización.

Al repetir los mismos estudios, pero con la presencia de dos alelos largos, vimos que solo salía significativo en relación con la severidad de la patología. Existe una mayor presencia de dos alelos largo-largo en los pacientes con esteatosis frente a esteatohepatitis, por lo que los

resultados obtenidos estarían en consonancia con los resultados obtenidos por Kuilenburg et al<sup>(30)</sup>.

La obtención de iPSCs a partir de las células epiteliales obtenidas de orina de pacientes es un método poco invasivo para obtener una fuente inagotable de iPSCs. Además, estas células tendrán la carga genética del paciente, permitiendo realizar estudios para testar fármacos teniendo en cuenta la genética. Durante la realización del trabajo, conseguimos sembrar un total de 15 orinas de pacientes EHmet, obteniendo células epiteliales en 5 de ellas. Uno de los problemas que hemos tenido durante estos meses es la escasa muestra de orina aportada por los pacientes, ya que necesitamos un mínimo de 50 ml, siendo la muestra menor en diversas ocasiones.

También hemos sido capaces de poner a punto el protocolo de reprogramación. Es un protocolo largo y de momento estamos en la fase de pre-iPSC. Cuando obtengamos iPSC, podríamos diferenciarlas a hepatocitos inducidos (iHep), para desarrollar un buen modelo para testar fármacos que actúen en la vía de la glutaminólisis. Esto nos permitiría testar los fármacos en base a la carga genética de los pacientes.

Una de las mayores limitaciones de este proyecto es el escaso número de pacientes que hemos podido incluir, por lo que, en un futuro, sería conveniente aumentar el tamaño muestral para obtener resultados más sólidos.

En un futuro, también se podría realizar a los pacientes la sobrecarga oral de glutamina (SOG) para poder relacionar los niveles de glutamina, glutamato y el ratio glutamato/glutamina séricos con los resultados obtenidos en la prueba SOG.

Sería buena idea estudiar la expresión de *GLS* en el tejido hepático de los pacientes, para ver si hay alguna relación entre los niveles de glutamato y glutamina con los resultados obtenidos tras la tinción de *GLS* del tejido hepático.

## CONCLUSIONES

- Los pacientes con esteatohepatitis mostraron niveles significativamente superiores de glutamato, y una mayor ratio glu/gln en comparación con los pacientes con esteatosis simple, reflejando una posible alteración en la ruta de la glutaminólisis.
- No existió una asociación entre los SNPs en *SLC1A3* y *SLC1A5* y la severidad de la patología, ni correlación con los niveles de glu/gln plasmáticos.
- La longitud del microsatélite en *GLS* se asoció con la presencia de esteatosis simple en nuestra cohorte, pudiendo estar relacionado con una menor expresión/actividad de la enzima. Sin embargo, no encontramos asociación con los niveles de glu/gln solubles.
- El aislamiento de epiteliales de orina de pacientes es una técnica relativamente sencilla y no invasiva y constituye un método eficiente para la obtención de iPSCs.
- La obtención de iPSCs de pacientes con distintos polimorfismos asociados a *GLS* constituirían un modelo in vitro óptimo para el estudio de los fármacos que actúen en esta vía.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mundi MS, Velapati S, Patel J, Kellogg TA, Abu Dayyeh BK, Hurt RT. Evolution of NAFLD and Its Management. *Nutr Clin Pract*. 2020;35(1):72–84. Doi: 10.1002/ncp.10449.
2. Kuchay MS, Choudhary NS, Mishra SK. Pathophysiological mechanisms underlying MAFLD. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2020;14(6):1875–87. Doi: 10.1016/j.dsx.2020.09.026
3. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of EHMET development and therapeutic strategies. Vol. 24, *Nature Medicine*. Nature Publishing Group; 2018. p. 908–22. Doi: 10.1038/s41591-018-0104-9
4. Turchinovich A, Baranova A, Drapkina O, Tonevitsky A. Cell-free circulating nucleic acids as early biomarkers for EHMET and EHMET-associated disorders. *Front Physiol*. 2018;9(SEP):1–13. Doi: 10.3389/fphys.2018.01256.
5. Byrne CD, Targher G. EHMET: A multisystem disease. Vol. 62, *Journal of Hepatology*. Elsevier; 2015. p. S47–64. Doi: 10.1016/j.jhep.2014.12.012.
6. Caligiuri A, Gentilini A, Marra F. Molecular pathogenesis of NASH. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9). Doi: 10.3390/ijms17091575
7. Madrideojos R. ¿ Qué Debería Saber El Médico De Familia Sobre...? 2018;24(7). Doi:
8. Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res*. 2013 Jan;52(1):165-74 Doi:
9. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, Huebener P, Mu X, Dapito DH, et al. Contributors To Liver Fibrosis Independent of Its Etiology. *Nat Commun*. 2013;4:2823. Doi:
10. Henderson NC, Forbes SJ. Hepatic fibrogenesis: From within and outwith. *Toxicology*. 2008;254(3):130–5. Doi: 10.1016/j.plipres.2012.10.004.
11. De Chiara F, Heebøll S, Marrone G, Montoliu C, Hamilton-Dutoit S, Ferrandez A, et al. Urea cycle dysregulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol [Internet]*. 2018;69(4):905–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.023>
12. Vela CIB, Padilla FJB. Determination of ammonia concentrations in cirrhosis patients- still confusing after all these years? *Ann Hepatol [Internet]*. 2011;10(SUPPL. 2):S60–5. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)31609-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1665-2681(19)31609-6)
13. Jalan R, De Chiara F, Balasubramanian V, Andreola F, Khetan V, Malago M, et al.

- Ammonia produces pathological changes in human hepatic stellate cells and is a target for therapy of portal hypertension. *J Hepatol* [Internet]. 2016;64(4):823–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.019>
14. Du K, Hyun J, Premont RT, Choi SS, Michelotti GA, Swiderska-Syn M, et al. Hedgehog-YAP Signaling Pathway Regulates Glutaminolysis to Control Activation of Hepatic Stellate Cells. *Gastroenterology*. 2018;154(5):1465-1479.e13. Doi: 10.1053/j.gastro.2017.12.022.
  15. Simon J, Nuñez-garcía M, Fernández-tussy P, Barbier-torres L, Fernández-ramos D, Gómez-santos B, et al. Targeting Hepatic Glutaminase 1 Ameliorates Non-alcoholic Steatohepatitis by Restoring Very-Low-Density Lipoprotein Triglyceride Assembly. 2021;31(3):605–22. Doi: 10.1016/j.cmet.2020.01.013
  16. Yang L, Venneti S, Nagrath D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng*. 2017;19:163–94. Doi: 10.1146/annurev-bioeng-071516-044546.
  17. Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Fujimoto Y, Fujitake M, et al. Dysfunctional very-low-density lipoprotein synthesis and release is a key factor in nonalcoholic steatohepatitis pathogenesis. *Hepatology*. 2009;50(3):772–80. Doi: 10.1002/hep.23094
  18. Caballero F, Fernández A, Matías N, Martínez L, Fucho R, Elena M, et al. Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: Impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione. *J Biol Chem*. 2010;285(24):18528–36. Doi: 10.1074/jbc.M109.099333
  19. Li H, Wang L, Yan X, Liu Q, Yu C, Wei H, et al. A proton nuclear magnetic resonance metabolomics approach for biomarker discovery in nonalcoholic fatty liver disease. *J Proteome Res*. 2011;10(6):2797–806. Doi: 10.1021/pr200047c
  20. Du K, Chitneni SK, Suzuki A, Wang Y, Henao R, Hyun J, et al. Increased Glutaminolysis Marks Active Scarring in Nonalcoholic Steatohepatitis Progression. *Cmgh* [Internet]. 2020;10(1):1–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.12.006>
  21. Younossi ZM, Ratziu V, Loomba R, Rinella M, Anstee QM, Goodman Z, et al. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2019;394(10215):2184–96. Doi: 10.1016/S0140-6736(19)33041-7.
  22. Del Campo JA, Gallego-Durán R, Gallego P, Grande L. Genetic and epigenetic regulation in nonalcoholic fatty liver disease (EHMET). *Int J Mol Sci*. 2018;19(3):5–10. Doi: 10.3390/ijms19030911.

23. Gil-Gómez A, Gómez-Sotelo AI, Ranchal I, Rojas Á, García-Valdecasas M, Muñoz-Hernández R, et al. Metformin modifies glutamine metabolism in an in vitro and in vivo model of hepatic encephalopathy. *Rev Esp Enfermedades Dig.* 2018;110(7):427–33. Doi: 10.17235/reed.2018.5004/2017
24. Romero-Gómez M, Jover M, Del Campo JA, Royo JL, Hoyas E, Galán JJ, et al. Variations in the promoter region of the glutaminase gene and the development of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: A cohort study. *Ann Intern Med.* 2010;153(5):281–8. Doi: 0.7326/0003-4819-153-5-201009070-00002
25. Harrison SP, Baumgarten SF, Verma R, Lunov O, Dejneka A, Sullivan GJ. Liver Organoids: Recent Developments, Limitations and Potential. *Front Med.* 2021;8(May):1–18. Doi: 10.3389/fmed.2021.574047
26. Kwak KA, Cho HJ, Yang JY, Park YS. Current Perspectives Regarding Stem Cell-Based Therapy for Liver Cirrhosis. Vol. 2018, *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology.* Hindawi Limited; 2018. Doi: 10.1155/2018/4197857
27. Malik N, Rao MS. A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol Biol.* 2013;997(5):23–33. Doi: 10.1007/978-1-62703-348-0\_3.
28. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot JL, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology.* 2012;56(5):1751–9. Doi: 10.1002/hep.25889
29. Bedossa P, Burt AA, Gouw AHA, Lackner C, Schirmacher P, Terracciano L, et al. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2014;60(2):565–75. Doi: 10.1002/hep.27173.
30. van Kuilenburg ABP, Tarailo-Graovac M, Richmond PA, Drögemöller BI, Pouladi MA, Leen R, et al. Glutaminase Deficiency Caused by Short Tandem Repeat Expansion in GLS. *N Engl J Med.* 2019;380(15):1433–41. Doi: 10.1056/NEJMoa1806627.